

ANALISIS MUTASI GEN PAX3 DAN GEN MITF PADA PENDERITA SINDROMA WAARDENBURG DI INDONESIA

Mutation analysis of PAX3 and MITF genes in Indonesian Waardenburg Syndrome family

Dewajani Purnomosari¹, Sukarti Moeljopawiro²,
dan Abdul Salam M Sofro¹

Program Studi Bioteknologi
Program Pascasarjana Universitas Gadjah Mada

ABSTRACT

Waardenburg syndrome (WS) is an autosomal dominant disorder characterized by *dystopia canthorum*, pigmentary disturbance of skin, hair and eye and sensorineural deafness. The basis for the phenotypic variability observed among and between WS families is unknown. In order to understand the molecular pathology of WS, many more data of the location and the type of mutation causing WS from many different families are needed. Therefore, the location and the type of mutation of WS in Indonesian families need to be identified. The previous studies of many WS families have shown that the majority of mutations are in PAX3 gene, while some are in MITF gene

In this studies the PAX3 gene and the MITF gene were analyzed from one Indonesian WS family. Survey at school for hearing handicapped was done in order to discover WS individual. Following the ascertainment of family history, each person was subjected to a physical and ear examination including a hearing test.

The blood from affected and unaffected individuals from this family were collected for DNA extraction using Quick Gene Isolation Kit. All exons of the PAX3 gene and MITF gene were amplified using PCR methods. To determine the presence of mutation in an exon, Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) methods were used, then followed by Silver Staining. If the SSCP pattern showed the difference between affected and unaffected individuals, sequencing of the suspected exon was performed.

In this study, one WS family was found and considered to be WS type I (WS 1) based on their clinical feature. SSCP pattern of 9 exons of MITF gene showed that there were no differences between affected and unaffected individuals. While SSCP pattern of 8 exons of PAX3 gene showed different bands on exon 4. So, it was suggested that the mutation would occur in this exon. Sequencing of this exon revealed that the changes of one base occurred at intronic region, which is g to a transition at 60 base up stream of exon 4.

It can be concluded that mutation was located at the intron, but whether these changes in the intronic region could influence the gene product, needs further elucidation.

Keywords: Waardenburg Syndrome – PAX3 – congenital deafness – MITF

1. Fakultas Kedokteran Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta
2. Fakultas Biologi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

PENGANTAR

Sindroma Waardenburg (WS) adalah kelainan dominan autosom yang ditandai dengan *dystopia canthorum* (pergeseran ke arah luar sudut sebelah dalam mata), gangguan pigmentasi pada mata, rambut dan kulit, serta gangguan pendengaran (Waardenburg, 1951). Berdasarkan kombinasi berbagai karakter tersebut, WS dibagi menjadi 4 tipe (Asher dan Friedman, 1990). WS tipe I (WS1) mempunyai ciri *dystopia canthorum*, sedang WS tipe II (WS2) tidak mempunyai ciri tersebut (Arias, 1971). WS3 (Klein-Waardenburg) dan WS4 (Waardenburg Shah) mempunyai kelainan anggota gerak (Klein, 1983) dan megakolon (Shah *et al.*, 1981).

Berdasarkan kemiripan fenotipnya, mencit *Spotch*, yang disebabkan oleh mutasi gen *Pax-3*, dipergunakan sebagai model WS pada manusia (Epstein *et al.* 1991). Mutasi gen *PAX3*, gen pada manusia yang homolog dengan gen *Pax-3* pada mencit, juga ditemukan pada penderita WS1, maka mutasi gen *PAX3* diduga merupakan penyebab penyakit ini (Tassabehji *et al.*, 1992; Baldwin *et al.*, 1992).

Gen *PAX3* merupakan anggota keluarga gen yang menjadi faktor transkripsi. Protein *PAX3* mempunyai pola pengikatan DNA yang sangat *conserved*, yaitu *paired domain*, *octapeptide* dan *homeodomain*, yang terlibat dalam aktivasi transkripsi (Chalepakis *et al.*, 1994). Studi perkembangan memperlihatkan bahwa gen *Pax-3* diekspresikan pada awal neurogenesis pada korda spinalis (*spinal cord*) dan otak, serta pada sel prekursor embrional neural crest, *craniofacial mesoderm* dan *limb mesenchyme* (Goulding *et al.* 1991).

Telah diketahui mutasi gen *PAX3* menyebabkan WS1 dan WS3 (Baldwin *et al.*, 1992; Tassabehji *et al.*, 1992), sedangkan tidak satupun kasus WS2 disebabkan oleh mutasi gen *PAX3* (Farrer *et al.*, 1994).

Diperoleh petunjuk bahwa mencit dengan mutasi pada alel *microphthalmia (mi)* merupakan model yang potensial untuk WS2 (Asher dan Friedman, 1990). Studi homologi menunjukkan gen *mi* pada mencit homolog dengan gen *MITF* pada manusia. Gen *MITF* dan *mi* menjadi protein *basic-helix-loop-helix-leucine zipper* (bHLHZip) (Hodgkinson *et al.*, 1993; Tachibana *et al.*, 1994). Mencit dengan mutasi pada alel *mi* dan individu WS2 tidak mempunyai melanosit pada organ yang terkena (Tachibana *et al.*, 1992). Karena itu, diduga *MITF* terlibat dalam proses diferensiasi melanosit dengan berperan sebagai faktor transkripsi (Tachibana *et al.*, 1996).

Masalah yang ingin dicari jawabannya ialah sebagai berikut. Keluarga WS yang ditemukan di Indonesia tipe apa, apa ada mutasi pada gen *MITF* dan mutasi terjadi dimana?

Penelitian terhadap penderita WS yang telah dilakukan di Indonesia dan di berbagai negara menunjukkan perbedaan letak dan macam mutasi. Maka untuk dapat mengetahui patologi molekuler WS diperlukan banyak data tentang letak dan macam mutasi penderita WS, sehingga perlu adanya analisis genetik dari banyak keluarga penderita

WS dari berbagai negara.

Penelitian ini diharapkan dapat mengungkap patologi molekuler sindroma Waardenburg, untuk selanjutnya diharapkan dapat membantu pengungkapan perkembangan embrional pada aras molekuler.

METODE PENELITIAN

Penderita WS

Penderita WS dicari di Sekolah Luar Biasa bagian B (sekolah untuk penderita tuli) di Malang, Jawa Timur dan satu keluarga yang ditemukan di Wonosobo, Jawa Tengah.

Primer

Primer untuk semua exon pada gen *PAX3* dan *MITF* diperoleh dari Laboratorium Graduate Program in Genetics, Michigan State University, East Lansing, Michigan (Tabel 1).

Tabel 1. Sekuen primer untuk amplifikasi exon-exon gen *PAX3* dan *MITF*

Gen *PAX3*

| Exon | Forward | Reverse |
|------|--------------------------|----------------------------|
| 1. | 5'CCGTTTCGCCCTTCACCTGGA | 5'GCGCTGAGGCCCTCCCTTAC |
| 2. | 5'ATTTTGCCCATTTGCTGTC | 5'CCGGTCTTCCCAACACAGG |
| 3. | 5'CCTGCCCGCCTGTTCTCT | 5'CGACTGACTGTGCGCGCT |
| 4. | 5'AGCCCTGCTTGCTCAACCATGT | 5TGCCCTCCAAGTCACCCAGCAAGT |
| 5. | 5'TCACTGTAATGGTGTCTTGC | 5'TCCTGTCTGGACTGAAGTAG |
| 6. | 5'AGAAGCCTCTAATCTGTTT | 5'GTTCGGACAACCTGATGTAT |
| 7. | 5'AGAAAACATGATGGTTGACAA | 5'GGTATACAGCAAAATCGTCTGTCT |
| 8. | 5'GCTCTTTTTTAGGTAATGGG | 5'CCGGCATGTCTGGCTTAATC |

Gen *MITF*

| Exon | Forward | Reverse |
|------|----------------------------|----------------------------|
| 1. | 5'GGATACCTTGTTTATAGTACCTTC | 5'AAAGAGCAGATTTATACTTATTG |
| 2. | 5'TCTGAAACTCACAATAACAGCGC | 5'TATTCAACAGACAAGTTATTTAGC |
| 3. | 5'CCATCAGCTTGTGTGAACAGGTC | 5'TTTCAGGAAGGTGTGATCCACCAC |
| 4. | 5'AACTAAAGACCATTATTGCTTTGG | 5'AGAAAAGAACCCTGGAAACACCTC |
| 5. | 5'ATAAATCCTAGAGTAGGATATAGG | 5'ACTTTGTCTTATCAGGAAATGGAC |
| 6. | 5'TCAAGTCAAATAAGCTTCTGTATG | 5'GTAGGAATCAACTCTCCTCTACAG |
| 7. | 5'GTGCTAAATGCATACATGGCACTG | 5'TTAGGAATAGAACCAAGGGAGAGC |
| 8. | 5'TTCATTGAGCCTCAAATCCTAAAG | 5'CTGTTTCTACTGTCTTGAAGTCGG |
| 9. | 5'AGTCCTCTGTGCTCGTCCTATTTC | 5'AAGCTAAAGTCTGTGGTGAATTC |

Pencarian penderita WS

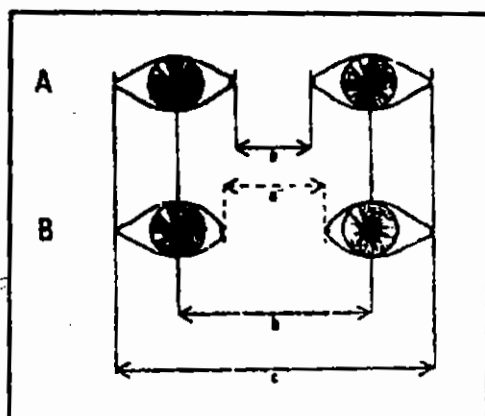
Penelusuran penderita WS dilakukan di Sekolah Luar Biasa bagian B (SLBB) di Jawa, dengan alasan bahwa ketulian merupakan salah satu ciri penderita WS. Dari siswa-siswa SLBB itu dicari individu yang mempunyai tanda-tanda klinis WS, selain tuli. Apabila sudah dijumpai, maka tahap selanjutnya adalah pelacakan keluarga penderita hingga dapat diperoleh suatu diagram silsilah.

Terhadap seluruh atau sebagian individu yang tercantum di dalam diagram silsilah dilakukan pemeriksaan fisik dan fungsi pendengaran. Pemeriksaan fisik meliputi pengukuran jarak antara kedua matanya untuk mengetahui ada tidaknya *dystopia canthorum* (Gambar 1), warna iris mata, kulit, rambut, dan morfologi telinga.

Pemeriksaan fungsi pendengaran dilakukan di dalam ruangan kedap suara dengan menggunakan audiometer nada murni yang telah dikalibrasi, oleh seorang dokter spesialis THT.

Darah sebanyak 10 ml diambil dengan jarum suntik dari pembuluh darah balik (vena) lengan.

DNA diisolasi dengan *Super Quick Gene Isolation Kit* (Analytical Genetic Testing Center, Inc.)



Gambar 1. Jarak bagian mata yang dipakai untuk mencirikan *dystopia canthorum*

A. Normal

B. *Dystopia canthorum*

a. Jarak kantung internus

b. Jarak pupil

c. Jarak kantung eksternus

Amplifikasi fragmen DNA dengan PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

Semua exon (8 exon gen *PAX3* dan 9 exon gen *MITF*) diamplifikasi sebanyak 30 daur, dan setiap daur terdiri atas suhu denaturasi 94°C selama 1 menit, suhu dan waktu *annealing* tergantung pada exon yang

diampifikasi, diteruskan dengan suhu 72°C selama 1 menit. Pada putaran ke30, waktu untuk suhu 72°C diperpanjang menjadi 10 menit.

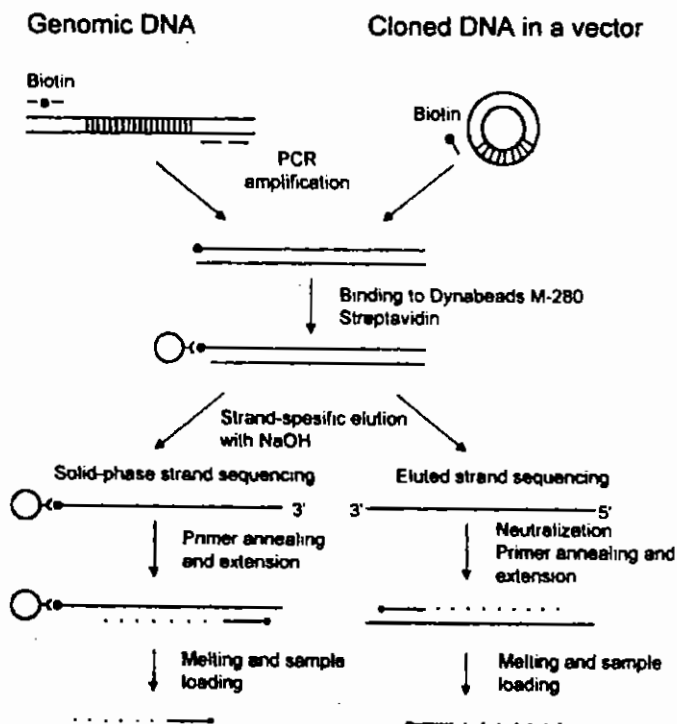
Perlakuan panas (*hot start*), yaitu pemanasan 95°C selama 5 menit diberikan sebelum penambahan enzim. Segera setelah suhu turun menjadi 85°C, enzim ditambahkan.

Dalam setiap 25 mL reaksi, digunakan 7,5 mL akuabides, 2,5 mL DNA template 40 ng/mL, 2,5 µM primer 5' dan 3' (Tabel 1) masing-masing 2,5 mL, 2,5 mL dNTP 2mM (Sigma), 2,5 mL larutan 10x buffer + gelatin, 2,5 mL MgCl₂ (E.Merck) dengan konsentrasi antara 10 mM sampai ke 30 mM, 2,5 mL enzim TSP 1 unit/mL.

SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Metode ini dipergunakan untuk mendeteksi ada tidaknya mutasi berdasarkan perubahan konformasi DNA untai tunggal. Prosedur dilakukan sesuai dengan Orita *et al.* (1989) dengan modifikasi pada proses perolehan DNA untai tunggal dan proses menampilkan *band* hasil SSCP.

DNA untai tunggal diperoleh dengan cara memanaskan sampel hasil PCR yang merupakan DNA untai ganda, dengan pemanasan pada suhu 95°C selama 4-5 menit. kemudian dilakukan *snap freeze* pada suhu -70°C, dengan menempatkan sampel ke dalam larutan *dry ice* dalam etanol, agar DNA untai tunggal tidak bersatu lagi (*reanneal*)



Gambar 2. Skema cara memperoleh DNA untai tunggal yang akan dipergunakan sebagai *template* sekuensing.

Band hasil elektroforesis pada MDE-gel akan tampak apabila dilakukan pewarnaan dengan perak nitrat. Cara ini ditempuh untuk menghindari penggunaan zat radioaktif, seperti dilakukan Orita *et al.* (1989).

Sekuensing dilakukan apabila terdapat kecurigaan pada hasil SSCP. Segmen DNA untai tunggal yang akan dipergunakan sebagai *template* sekuensing, diperoleh dengan cara seperti terlihat pada Gambar 2. Prosedur sekuensing sesuai Sanger *et al.* (1977).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pencarian penderita WS

Dari 30 orang siswa Sekolah Luar Biasa bagian B (SLBB) hanya 2 orang siswa (putra dan putri) yang dicurigai sebagai penderita WS karena menunjukkan salah satu karakter WS yaitu *dystopia canthorum*. Menurut Arias (1971), seseorang dikatakan menderita *dystopia canthorum* apabila rasio jarak antara kedua kantung internus dengan jarak kedua pupil (a/b) $> 0,60$. Hasil pengukuran jarak mata siswa putra menunjukkan rasio $a/b = 0,681$, sedangkan siswa putri $0,687$.

Pelacakan terhadap keluarga siswa putra dan putri menunjukkan bahwa keduanya bukan keluarga WS karena tidak ada riwayat ketulian pada kedua keluarga tersebut, dan tidak dijumpai karakter WS lain pada anggota keluarganya.

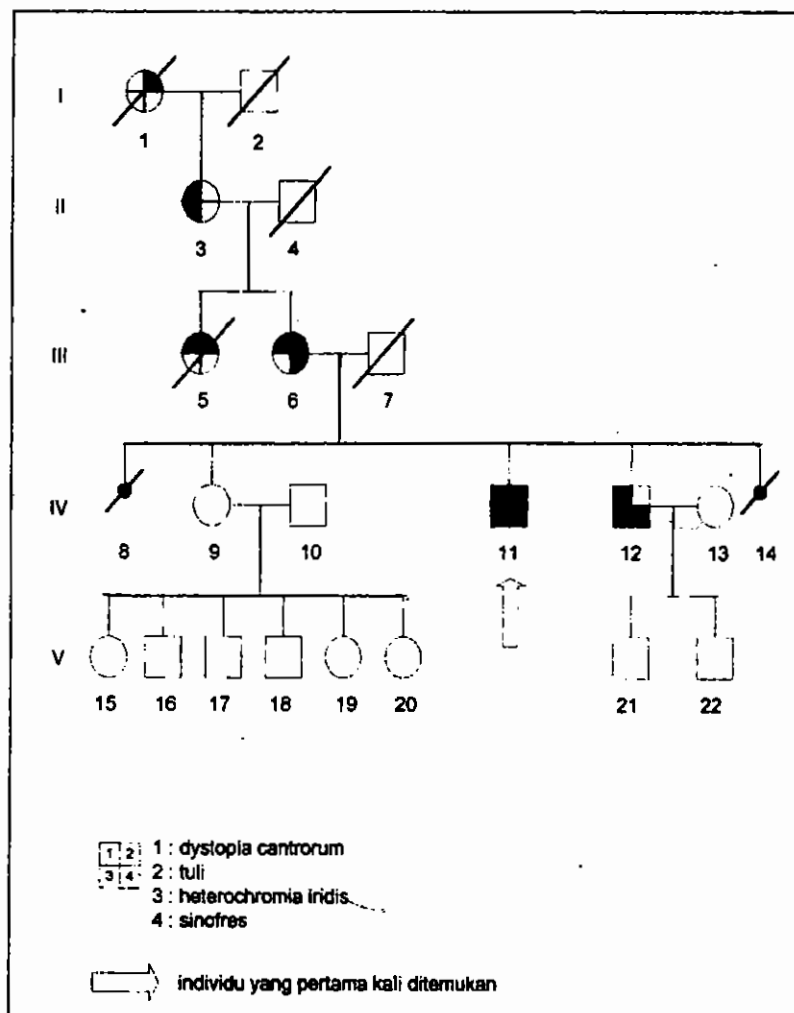
Dari informasi keluarga WS Kotamadya Yogyakarta yang berhasil dianalisis sebelumnya, diketahui bahwa ada keluarga di Wonosobo yang mempunyai keanehan pada matanya, maka dilakukan pelacakan terhadap keluarga tersebut.

Pelacakan keluarga Wonosobo menunjukkan bahwa beberapa anggota keluarga tersebut menampakkan fenotip *dystopia canthorum*, mengalami gangguan pendengaran dan gangguan pigmentasi pada mata dan rambut. Berdasarkan hasil pemeriksaan fisik dan fungsi pendengaran, diperkirakan 4 orang menderita WS, sedang sisanya normal. Silsilah keluarga (*pedigree*) dapat dilihat pada Gambar 3.

Berdasarkan ciri fenotip yang tampak pada individu penderita, yaitu adanya *dystopia canthorum*, maka dapat disimpulkan bahwa keluarga WS yang dijumpai adalah WS tipe I (WS1)

Sifat pewarisan WS tampak pada keluarga ini (Gambar 3), individu penderita terdapat pada setiap generasi, kecuali generasi ke-5 (individu 21 dan 22), karena yang bersangkutan masih terlalu kecil untuk diperiksa (20 dan 6 bulan) dan sindroma ini diderita oleh sebagian besar keturunan, tanpa membedakan jenis kelaminnya.

Farrer *et al.* (1994) menyatakan bahwa WS1 disebabkan oleh mutasi gen *PAX3*, dan tidak disebabkan oleh mutasi gen *MITF*. Pada penelitian ini tetap dilakukan analisis mutasi terhadap kedua gen (gen *PAX3* dan gen *MITF*) untuk membuktikan dan memperkuat pernyataan tersebut.



Gambar 3. Pedigree keluarga WS di Wonosobo

Analisis DNA

DNA yang diperoleh dari hasil isolasi DNA darah, diamplifikasi dengan cara PCR. Untuk memperoleh hasil amplifikasi yang optimum, masing-masing exon untuk gen *PAX3* (8 exon) dan *MITF* (9 exon) memerlukan kondisi optimum. Hasil optimasi amplifikasi PCR dapat dilihat pada Tabel 2. Apabila amplifikasi dilakukan pada kondisi tidak optimum, maka akan menyebabkan timbulnya *non spesifik band*, *primer dimer* atau jumlah produk yang rendah. Produk amplifikasi seperti ini tidak dapat digunakan, karena dapat memberikan hasil yang membingungkan.

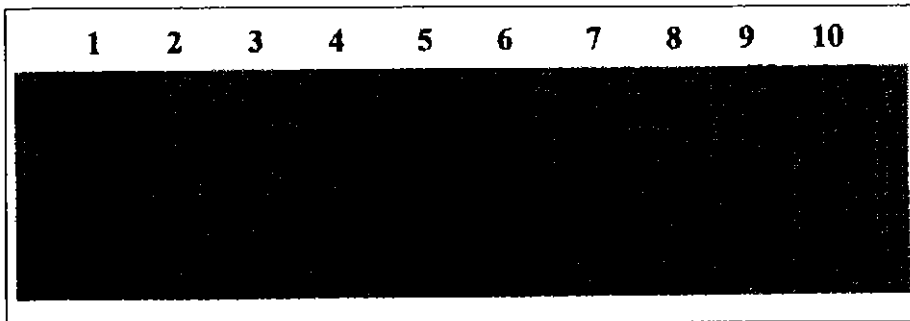
Tabel 2. Kondisi optimal untuk PCR exon-exon pada gen *PAX3* dan *MITF*

| Gen | Exon | Konsentrasi MgCl ₂ (mM) | Suhu Annealing (°C) | Waktu Annealing (detik) |
|-------------|------|---------------------------------------|------------------------|----------------------------|
| <i>PAX3</i> | 1 | 2,0 | 61 | 60 |
| | 2 | 3,0 | 61 | 100 |
| | 3 | 1,5 | 60 | 64 |
| | 4 | 1,0 | 60 | 64 |
| | 5 | 3,0 | 55 | 100 |
| | 6 | 3,0 | 55 | 100 |
| | 7 | 2,0 | 50 | 60 |
| | 8 | 3,0 | 50 | 60 |
| <i>MITF</i> | 1 | 3,0 | 55 | 45 |
| | 2 | 3,0 | 55 | 45 |
| | 3 | 3,0 | 55 | 45 |
| | 4 | 2,0 | 55 | 45 |
| | 5 | 3,0 | 55 | 45 |
| | 6 | 3,0 | 55 | 45 |
| | 7 | 3,0 | 55 | 45 |
| | 8 | 3,0 | 55 | 45 |
| | 9 | 3,0 | 55 | 45 |

Untuk mendeteksi ada tidaknya mutasi pada gen *PAX3* dan gen *MITF*, maka masing-masing exon yang diperoleh dari amplifikasi, dianalisis dengan SSCP. Dasar kemampuan metode ini mendeteksi mutasi adalah bahwa adanya perubahan sekuen DNA di dalam suatu segmen akan menyebabkan perubahan konformasi DNA untai tunggal. Perubahan ini menyebabkan kecepatan migrasi yang tidak sama pada *polyacrylamide gel electrophoresis* (PAGE), sehingga menghasilkan *band* yang berbeda (Orita *et al.*, 1989).

Hasil SSCP menampilkan pola-pola *band* yang berbeda-beda antara satu exon dengan exon lainnya. Setiap satu exon dianalisis pada satu gel, yang terdiri atas individu penderita dan individu normal. Apabila terjadi mutasi pada individu penderita, maka pola *band* penderita tidak akan sama dengan pola *band* individu normal.

Hasil SSCP untuk exon-exon gen *PAX3* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan pola *band* antara individu normal dan penderita, kecuali exon 4. Hasil SSCP exon 4 memperlihatkan 3 buah *band* pada individu penderita, sedangkan individu normal menunjukkan 4 buah *band* (gambar 4). Untuk memastikan perbedaan tersebut, maka analisis SSCP untuk exon 4 gen *PAX3* ini diulang lima kali dari produk PCR yang berbeda, dan menunjukkan hasil yang konsisten. Dengan hasil ini, ada kecurigaan bahwa mutasi terletak pada exon 4 gen *PAX3*.



Gambar 4. SSCP exon 4 gen PAX3 keluarga WS di Indonesia

Lajur 1,2,3,5,6 dan 7 adalah hasil SSCP individu penderita, lajur 4,8,9 dan 10 adalah hasil SSCP individu normal. Tampak perbedaan jumlah *band* pada penderita (3 *band*) dan individu normal (4 *band*)

Sesuai dengan hasil penelitian-penelitian sebelumnya, sebagian besar mutasi penyebab WS1 terletak pada gen PAX3 (Hoth *et al.*, 1993, Tassabehji *et al.*, 1993, Tassabehji *et al.*, 1994; Baldwin *et al.*, 1994; Farrer *et al.*, 1994, Butt *et al.*, 1994, Hol *et al.*, 1995, Lalwani *et al.*, 1995, Asher *et al.* 1996, Reynolds *et al.* 1996, Soejima *et al.*, 1997), juga satu keluarga Indonesia yang berhasil dianalisis (Morell *et al.*, 1992). Dengan demikian, perbedaan pola *band* hasil SSCP antara penderita dengan individu normal pada exon 4 gen PAX3 ini semakin memperkuat dugaan bahwa mutasi pada keluarga Wonosobo ini terjadi pada exon tersebut.

Hasil SSCP exon-exon pada gen MITF tidak menunjukkan adanya perbedaan *band* antara penderita dan individu normal. Dengan demikian, seperti yang telah diduga, hasil SSCP ini semakin memperkuat pernyataan para ahli, bahwa WS1 tidak disebabkan oleh mutasi pada gen MITF.

Berdasarkan konsistensi hasil SSCP pada exon 4 PAX3 yang menunjukkan perbedaan pola *band* antara penderita dan individu normal, maka dilakukan sekuensing untuk mengetahui jenis mutasi yang terjadi. Dua macam teknik sekuensing, yaitu sekuensing manual dan sekuensing otomatis, digunakan dalam penelitian ini. Metode yang dipilih untuk sekuensing adalah *direct sequencing*, dan template yang digunakan berasal dari amplifikasi PCR dengan primer yang telah dilabel dengan biotin.

Hasil sekuensing manual (Gambar 5) menunjukkan hal yang diluar dugaan, karena ternyata tidak dijumpai perbedaan sekuen DNA yang menyusun exon 4 PAX3 antara penderita dan individu normal. Pada hasil sekuensing manual menunjukkan bahwa sekuen DNA pada exon 4 gen PAX3 penderita dan individu normal persis sama. Namun hasil sekuensing otomatis menunjukkan perbedaan satu basa pada daerah intron yang terletak 60 basa *topstream* exon 4 PAX3 atau 66 basa *downstream* exon 3 PAX3, yaitu perubahan basa g menjadi a.

| | | | |
|---------|--|--|-----|
| | ↓ | | |
| B4 (+I) | AGCCCTGCTTGTCTCAACCATGTGCGCTCCCTTGCTTCCCTTCTCTCCGCCCCCAG | 79 | |
| DNA 1 | AAGCCCTGCTTGTACNCAACCATGTGCGCHCCCTTGCTTCCCTACCAACCCCGCCCCCAG | 79 | |
| DNA 2 | AAGCCCTGCTTGTCTCAACCATGTGCGCTCCCTTGCTTCCCTTCTCTCCGCCCCCAG | 79 | |
| DNA 3 | AAGCCCTGCTTGTCTCAACCATGTGCGCTCCCTTGCTTCCCTTCTCTCCGCCCCCAG | 79 | |
| DNA 4 | AGCCCTGCTTGTCTCAACCATGTGCGCTCCCTTGCTTCCCTTCTCTCCGCCCCCAG | 79 | |
| DNA 5 | AGCCCTGCTTGTCTCAACCATGTGCGCTCCCTTGCTTCCCTTCTCTCCGCCCCCAG | 79 | |
| | 51 | EXON 4 | 120 |
| B4 (+I) | AGTTCCATCAGCCGCATCCTGAGAGTAAATTCGGGAAAGGTGAAGAGGAGGAGGCCGAC | | |
| DNA 1 | AGTTCCATCAGCCGCATCCTGAGAGTAAATTCGGGAAAGGTGAAGAGGAGGAGGCCGAC | | |
| DNA 2 | AGTTCCATCAGCCGCATCCTGAGAGTAAATTCGGGAAAGGTGAAGAGGAGGAGGCCGAC | | |
| DNA 3 | AGTTCCATCAGCCGCATCCTGAGAGTAAATTCGGGAAAGGTGAAGAGGAGGAGGCCGAC | | |
| DNA 4 | AGTTCCATCAGCCGCATCCTGAGAGTAAATTCGGGAAAGGTGAAGAGGAGGAGGCCGAC | | |
| DNA 5 | AGTTCCATCAGCCGCATCCTGAGAGTAAATTCGGGAAAGGTGAAGAGGAGGAGGCCGAC | | |
| | 121 | | 180 |
| B4 (+I) | TTGGAGAGGAAGGAGGCAGAGGAAAGCGAGAAGAAGGCCAAACACAGCATCGACGGATC | | |
| DNA 1 | TTGGAGAGGAAGGAGGCAGAGGAAAGCGAGAAGAAGGCCAAACACAGCATCGAC - GAATC | | |
| DNA 2 | TTGGAGAGGAAGGAGGCAGAGGAAAGCGAGAAGAAGGCCAAACACAGCATCGACGGATC | | |
| DNA 3 | TTGGAGAGGAAGGAGGCAGAGGAAAGCGAGAAGAAGGCCAAACACAGCATCGACGGATC | | |
| DNA 4 | TTGGAGAGGAAGGAGGCAGAGGAAAGCGAGAAGAAGGCCAAACACAGCATCGACGGATC | | |
| DNA 5 | TTGGAGAGGAAGGAGGCAGAGGAAAGCGAGAAGAAGGCCAAACACAGCATCGACGGATC | | |
| | 181 | | |
| B4 (+I) | CTGAGCGAGCGAG | GTAAGCGGTGGC - CCTTGGGC - GGCGCACTTGGTGGGTGACTTGGAGG | |
| DNA 1 | CTGAGCGAGCGAG | GTAAGCGGTGGCGCCTTGGGC - GGCGC | |
| DNA 2 | CTGAGCGAGCGAG | GTAAGCGGTGGCGCCTTGGGC - GGCGC | |
| DNA 3 | CTGAGCGAGCGAG | GTAAGCG - TGGCGCCTTGGGC - GGCGC | |
| DNA 4 | CTGAGCGAGCGAG | GTAAGCGGTGGCGCCTTGGGC - GGCGC | |
| DNA 5 | CTGAGCGAGCGAG | GTAAGCGGTGGCGCCTTGGGC - GGCGC | |

Gambar 5. Sekuen DNA exon 4 gen *PAX3* hasil sekuensing otomatis.

DNA 1, 2, dan 3 penderita, DNA 4 dan 5 individu normal. Terdapat perbedaan nukleotida antara penderita dan individu normal pada basa kedua dari ujung 5' primer (→)

Mutasi pada daerah intron pernah dijumpai oleh Tassabehji *et al.* (1994), yaitu pada satu basa yang terletak tepat sesudah exon 1 *MITF*. Mutasi pada basa intronik tersebut mengakibatkan perubahan pembacaan sehingga pembacaan intron diteruskan sampai 18 kodon *downstream*. Apakah perbedaan basa yang terletak pada bagian tengah intron ini berpengaruh terhadap produk protein yang dihasilkan dapat diteliti menggunakan metode cDNA, seperti yang dilakukan oleh Baldwin *et al.* (1994).

Dengan menggunakan metode yang sama, diperkirakan macam mutasi pada keluarga WS ini dapat diketahui. Pencarian letak mutasi tetap dititikberatkan pada gen PAX3, karena fenotip WS1 yang tampak pada keluarga yang diteliti, dan sampai saat ini belum diketahui dengan pasti basa intronik yang dibuang pada proses *splicing* (Baldwin et al., 1994).

KESIMPULAN

1. Keluarga WS yang berhasil ditemukan adalah keluarga WS tipe I (WS1).
2. Mutasi tidak dijumpai pada gen MITF.
3. Mutasi terjadi pada intron gen PAX3, berupa penggantian basa g menjadi a pada posisi 60 basa upstream exon 4.

Ucapan terimakasih

Ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kami ucapkan kepada dr Sofia Mubarika Haryana, M.Med.Sc, PhD yang telah banyak membantu penelitian ini. Terima kasih juga kami ucapkan kepada Prof. James H Asher, Jr (alm) dan Prof. Thomas B Friedman yang telah memberikan primer untuk amplifikasi PCR.

DAFTAR PUSTAKA

- Arias, S., 1971, Genetic heterogeneity in the Waardenburg Syndrome, *Birth Defect Original Article Series (VII)*, 87-101
- Asher, J.H, Jr., and Friedman, T.B., 1990, Mouse and hamster mutants as models for Waardenburg Syndrome in humans, *J.Med.Genet.*, 27, 618-626
- Asher, J.H, Jr., Sommer, A., Morell R., and Friedman, T.B., 1996, Missense Mutation in the Paired Domain of PAX3 Causes Craniofacial-Deafness-Hand Syndrome, *Human Mutation*, 7: 30-35.
- Baldwin, C.T., Hoth, C.F., Amos, J.A, da Silva, E.O., and Milunsky, A., 1992, An Exotic mutation in the HuP2 paired domain gene causes Waardenburg's Syndrome, *Nature* 355: 637-638
- Baldwin, C.T., Lipsky, N.R., Hoth, C.F., Cohen, T., Mamuya, W., and Milunsky, A., 1994, Mutation in PAX3 Associated With Waardenburg Syndrome Type 1, *Human Mutation*, 3: 205-211.
- Butt, J., Greenberg, J., Winship, I., Sellars, S., Beighton, P., and Ramesar, R., 1994, A splice junction mutation in PAX3 causes Waardenburg syndrome in a South African Family, *Hum. Mole. Genet*, vol.3, nol :197-198.
- Chalepakis, G., Jones, F.S., Edelman, G.M. dan Gruss, P., 1994, Pax-3 contains domains for transcription activation and transcription inhibition, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 12745- 12749.

- Epstein, D.J., Vekemans, M., and Gros, P., 1991, Splotch (Sp2H) a Mutation Affecting Development of the Mouse Neural Tube, shows a Deletion within the Paired Homeodomain of *Pax-3*, *Cell* 67: 767-774
- Farrer, L.A., Arnos, K.S., Asher, J.H., Jr., Baldwin, C.T., Diehl, S.R., Friedman, Y.B., Greenberg, J., Grundfast, K.M., Hoth, C., Lalwani, A.K., Landa, B., Leverton, K., Milunsky, A., Morell, R., Nance, W.E., Newton, V.E., Ramesar, R., Rao, V.S., Reynolds, J.E., San Agustin, T.B., Wilcox, E.R., Winship, I., and Read, A.P., 1994, Locus heterogeneity for Waardenburg Syndrome is Predictive of Clinical Subtypes, *Am. J. Hum. Genet.*, 55: 001-010.
- Goulding, M.D., Chalepakis, G., Deutch, U., Erselius, J.R., and Gruss, P., 1991, *Pax-3*, a novel murine DNA binding protein expressed during early neurogenesis, *EMBO J.* 10 (5): 1135-1147.
- Hodgkinson, C.A., Moore, K.J., Nakayama, K., Steingrimsdottir, E., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Arnheiter, H., 1993, Mutations at the mouse microphthalmia locus are associated with defects in a gene encoding a novel basic-helix-loop-helix zipper protein, *Cell*, 74:395-404.
- Hol, F.A., Hamel, B.C.J., Geurds, M.P.A., Mullaart, R.A., Barr, F.G., Macina, R.A., and Mariman, E.C.M., 1995, A frameshift mutation in the gene for *PAX3* in a girl with spina bifida and mild signs of Waardenburg syndrome, *J. Med. Genet.*, 32:32-56.
- Hoth, C.F., Milunsky, A., Lipsky, N., Shetler, R., Clarren, S., and Baldwin, C.T., 1993, Mutation in the Paired Domain of Human *PAX3* Gene Cause Klein Waardenburg Syndrome (WS-III) as well as Waardenburg Syndrome Type I (WS-I), *Am. J. Hum. Genet.*, 52: 455-462.
- Klein D., 1983, Historical background and evidence for dominant inheritance of the Klein-Waardenburg syndrome (type 11:1) *Am. J. Med. Genet.*, 14: 231-239.
- Lalwani, A.K., Brister, J.R., Fex, J., Grundfast, K.M., Ploplis, B., San Agustin, T.B., and Wilcox, E.R., 1995, Further Elucidation of the Genomic Structure of *PAX3*, and Identification of Two Different Point Mutations within the *PAX3* Homeobox That Cause Waardenburg Syndrome Type I in Two Families, *Am. J. Hum. Genet.*, 56 :75-83.
- Morell R., Friedman, T.B., Moeljopawiro, S., Hartono, Soewito, Asher, J.H., Jr., 1992, A frameshift mutation in the HuP2 paired domain of the probable human homolog of murine *Pax-3* is responsible for Waardenburg syndrome type I in an Indonesian family, *Hum. Mol. Genet.* 1:243-247.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., and Sekiya, T., 1989, Detection of polymorphism of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphism, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol 86: 2766-2770.
- Reynolds, J.E., Marazita, M.L., Meyer, J.M., Stevens, C.A., Eaves, L.J., Arnos, K.S., Ploughman, L.M., MacLean, A., Nance, W.E., and Diehl, S.R., 1996, Major locus Contributions to Variability of the Craniofacial Feature *Dystopia canthotilum* in Waardenburg Syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 58 :384-392.

- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 74:5463-5467.
- Shah, K.N., Dalal, S.J., Desai, M.P., Sheth, P.N., Joshi, N.C., Ambani, L.M., 1981 White forelock pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: possible variant of Waardenburg syndrome, *J. Pediatr* 99: 432-435.
- Soejima, H., Fujimoto, M., Tsukamoto K., Matsumoto N., Yoshiura K.I., Fukushima Y., Jinno Y., and Niihara N., 1997, Three Novel PAX3 Mutation Observed in Patients With Waardenburg Syndrome Type 1 *Human Mutation* 9: 177-180. .
- Tachibana M., Hara Y., Vyas d., Hodgkinson C., Fex J., Grundfast K., Arnheiter H., 1992, Cochlear disorder associated with melanocyte anomaly in mice with a transgenic insertional mutation, *Mol. Cell. Neurosci.*, 3:433-445.
- Tachibana, M., Perez-Jurado, L.A., Nakayama, A., Hodgkinson, C.A., Xu Li, Schneider, M., Miki, T., Fex, J., Francke, U., and Arnheiter, H., 1994, *Human Molecular Genetic*, vol.3, no.4: 55355.
- Tachibana, M., Atkeda, K., Nokubuni, Y., Urabe, K., Long, J.E., Meyes, K.A., Aaronson, S.A., and Miki, T., 1996, Ectopic expression of MITF, a gene for Waardenburg syndrome type 2, convert fibroblasts to cell with melanocyte characteristics, *Nature Genetics*, vol . 14.
- Tassabehji, J., Read, A.P., Newton, V.E., Harris, R., Balling, R., Gruss, P., and Strachan, T., 1992, Waardenburg's Syndrome patients have mutations in the human homologue of the *pax-3* paired box gene, *Nature* 355 :635-636
- Tassabehji, M., Read, A.P., Newton, V.E., Patton, M., Gruss, P., Harris, R., and Strachan, T., 1993, Mutation in the PAX3 gene causing Waardenburg syndrome type 1 and type 2, *Nature Genetics*, vol.3.
- Tassabehji, M., Newton, V.E., Levertov, K., Turnbull, K., Seemanova, E., Kunze, J., Sperling, K., Strachan, T., and Read, A.P., 1994, PAX3 gene structure and mutations: close analogies between Waardenburg syndrome and the Splotch mouse, *Hum. Mol. Genet.*, 3: 1069-1074.
- Waardenburg, P.J., 1951 A new Syndrome combining developmental anomalies of the eyelids eyebrows and nose root with pigmentary defects of the iris and the head hair with congenital deafness *Amer. J. Hum. Genet.* 3: 195-253